

Bioprospecção de fungo filamentososo na produção de micoproteína

Bioprospecting of filamentous fungus in the production of mycoprotein

RESUMO

Eduardo da Silva Pereira Ronning
Eduardo.1998@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

Mário Antônio Alves da Cunha
mcunha@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

Marcelo Luis kuhn Marchioro
marchioro82@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

As micoproteínas pertencem ao grupo das proteínas dietéticas não derivadas de animais, biodisponíveis e insulínótropas. Disponíveis no mercado desde 1985, apresentam popularidade crescente e reputação de segurança. O perfil de baixa energia, baixo teor de gordura e alto teor de fibras as tornam fontes saudáveis de proteínas. O Presente trabalho estudou a produção de biomassa micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Metodologia de planejamento experimental (DCCR 2³) foi empregada para maximizar a produção de biomassa celular em meio a base de sacarose. A produção máxima de biomassa estimada pelo modelo foi de 24,439 gL⁻¹, utilizando agitação de 413 rpm, concentração de sacarose de 271,25 gL⁻¹ e concentração de extrato de levedura de 5,94 gL⁻¹. A maior resposta para rendimento estimada pelo modelo foi de 0,233 gg⁻¹, utilizando agitação de 172,6 rpm, concentração de sacarose de 58,15 gL⁻¹. A variável concentração de extrato de levedura não apresentou efeito significativo sobre o parâmetro rendimento.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprocesso. Otimização. Micoproteína.

ABSTRACT

Recebido: XXXX. 2020.

Aprovado: XXXX. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



Mycoproteins belong to the group of non-animal, bioavailable and insulinotropic dietary proteins. Available on the market since 1985, they have increased popularity and a reputation for safety. The low-energy, low-fat and high-fiber profile make them healthy sources of protein. The present work studied the mycelial biomass production of the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Experimental planning methodology (DCCR 2³) was used to maximize the production of cellular biomass in a sucrose-based medium. The maximum biomass production estimated by the model was 24.439 gL⁻¹, using agitation of 413 rpm, sucrose concentration of 271.25 gL⁻¹ and yeast extract concentration of 5.94 gL⁻¹. The highest yield response estimated by the model was 0.233 gg⁻¹, using agitation of 172.6 rpm and sucrose concentration of 58.15 gL⁻¹. The yeast extract concentration variable did not have a significant effect on the yield parameter.

KEYWORDS: Bioprocess. Optimization. Mycoprotein.



INTRODUÇÃO

As micoproteínas, também chamadas de proteínas unicelulares, são proteínas dietéticas não derivadas de animais, biodisponível e insulínica. Consumida em quantidades suficientes, é esperado que estas suportem o anabolismo e o condicionamento da musculatura esquelética e, portanto, tenham clara utilidade para a saúde muscular (Dunlop, 2017).

Os produtos com micoproteína comercializados atualmente estão no mercado desde 1985 e veem demonstrando uma popularidade crescente, além de possuírem uma reputação de segurança de longa data. Os riscos de reações alérgicas mostram-se iguais ou inferiores aos de outras fontes de proteínas. O perfil de baixa energia, baixo teor de gordura e alto teor de fibras as tornam fontes saudáveis de proteína. Evidências atuais também indicam benefícios mais amplos como: saciedade potencial e benefícios metabólicos e musculares (Derbyshire, 2019).

Este trabalho buscou otimizar a produção de biomassa micelial do fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, considerando-a como uma potencial fonte de proteínas. Meio sintético a base de sacarose foi empregado nos cultivos e um delineamento composto central rotacional (DCCR 2³) foi usado para avaliar a influência dos parâmetros agitação, concentração de sacarose e extrato de levedura sobre o conteúdo micelial. O trabalho consistiu em um estudo inicial para averiguar a potencialidade de uso do fungo *L. theobromae* MMPI na produção industrial de micoproteína, para uso humano e/ou ração animal.

METODOLOGIA

MANUTENÇÃO DA CEPA FÚNGICA E PREPARO DE INÓCULO

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi mantido em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol sob refrigeração (4 °C) através de repiques sucessivos. Para o preparo do inóculo uma porção de micélio de cultura estoque foi transferida para meio ágar Sabouraud com cloranfenicol e cultivado em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 h. O micélio crescido nas placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral de Vogel (MMV) (VOGEL, 1956) e 5 gL⁻¹ de glicose e incubado a 28 °C, 150 rpm por 48 h em agitador orbital (shaker). A biomassa micelial obtida no pré-inóculo foi homogeneizada assepticamente em mixer formando uma suspensão micelial concentrada. A suspensão micelial foi diluída em solução salina (0,9% mv⁻¹) esterilizada obtendo-se uma suspensão com concentração padronizada com leituras de absorção em 400 nm entre 0,4 e 0,5.

CULTIVO SUBMERSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL

A produção de biomassa micelial de *L. theobromae* MMPI em meio sintético contendo sacarose como substrato limitante foi avaliada através de experimentos conduzidos de acordo com metodologia de planejamento experimental (Tabela 1). Um delineamento composto central rotacional (DCCR 2³) foi empregado para

estudar a influência das variáveis concentração de substrato (sacarose), concentração de extrato levedura (fonte de nitrogênio) e velocidade de agitação sobre o crescimento micelial (produção de biomassa celular).

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético a base de sacarose. Um volume 10 mL do inóculo previamente padronizado foi adicionado aos meios e os frascos foram incubados em incubadora orbital (shaker) por 96 h a 28 °C.

O meio sintético foi constituído por sacarose e extrato de levedura seguindo as concentrações descritas no delineamento experimental (Tabela 1).

Tabela 1 - Planejamento experimental – DCCR 2³

Experimentos	Variáveis independentes (valores codificados)		
	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0
18(C)	0	0	0

Variáveis		Níveis (valores reais)				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Concentração de Sacarose (gL ⁻¹)	X1	6,4	20	40	60	73,6
Extrato de Levedura (gL ⁻¹)	X2	0,2	1	2,5	4	5,02
Agitação (rpm)	X3	99,6	120	150	180	200,4

Fonte: Autoria própria.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIOMASSA FÚNGICA

O caldo fermentado foi separado da biomassa por centrifugação a 1500 x g/ 15 min. Em seguida, a biomassa fúngica passou por processo de lavagem três vezes com 80 mL de água destilada a 70 °C, garantindo completa remoção da lasiodiplodana (polissacarídeo extracelular) aderida ao micélio e então foi seca em estufa com circulação de ar a 50 °C até massa constante. Depois de seca, o teor de biomassa foi determinado por gravimetria.

DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DO SUBSTRATO

Açúcares residuais totais foram determinados pelo método Fenol-Sulfúrico, descrito por DuBois et al. (1956), no meio fermentativo após remoção do exopolissacarídeo e secagem em estufa com circulação de ar a 60 °C.

DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO EM BIOMASSA ($Y_{X/S}$)

O rendimento em biomassa micelial foi calculado conforme equação abaixo:

Determinado pela relação entre a quantidade de biomassa produzida (X) e a correspondente variação do substrato (S).

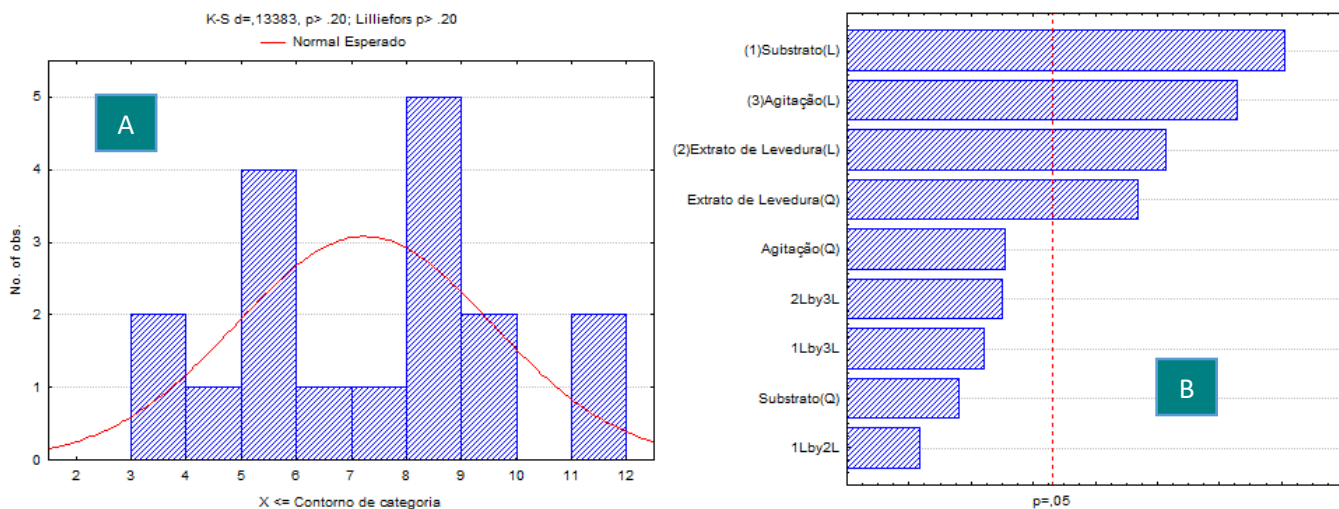
$$Y_{X/S} = \frac{\text{biomassa celular (g/L)}}{\text{consumo de substrato (g/L)}} \quad (1)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO, EXTRATO DE LEVEDURA E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO EM BIOMASSA

A Figura 1A apresenta o histograma de normalidade para os dados de produção de Biomassa:

Figura 1: histograma de distribuição normal para Produção de Biomassa (A).
 Diagrama de Pareto para a produção de Biomassa (B).



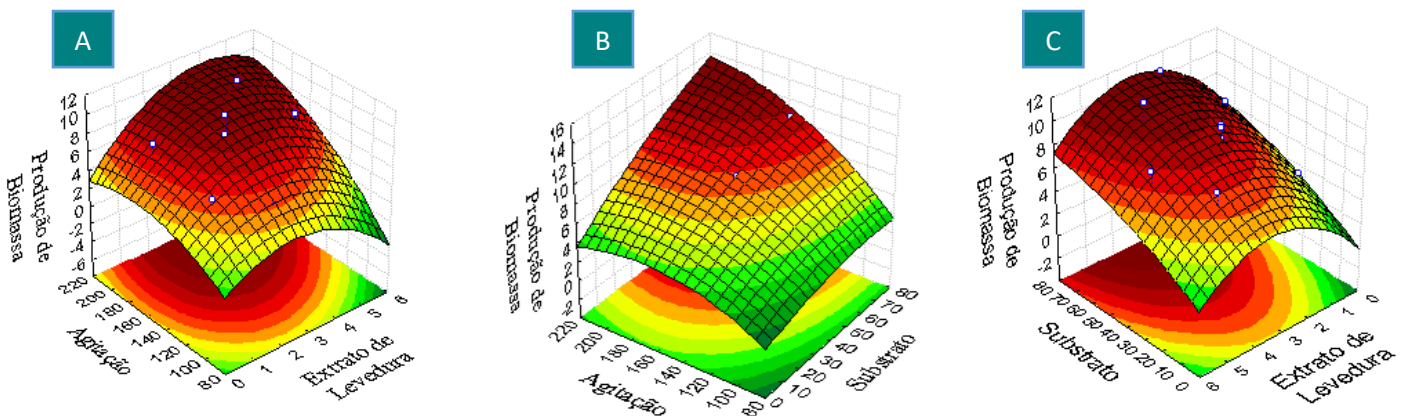
Fonte: Autoria Própria

Conforme pode ser verificado na Figura 1A, o valor do coeficiente de Kolmogorov-Smirnove (K-S d) é maior que Alpha ($\alpha= 0.05$), apresentando normalidade a um nível de 95% de confiança. Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser observados através do diagrama de Pareto (Figura 1B), no qual valores localizados a direita da a linha tracejada são considerados significativos, analisados no nível de significância de 5%.

Observa-se que as variáveis: Concentração de Sacarose (efeito Linear), Agitação (efeito Linear), Extrato de Levedura (efeito Linear e Quadrático) apresentaram significância estatística com nível de confiança de 95%.

Com intenção de facilitar a visualização dos efeitos, foi construída a superfície de resposta (Figura 2). Inicialmente é apresentada (Figura 2A) a superfície de resposta para as variáveis Agitação e Extrato de Levedura, seguida da (Figura 2B) Agitação e Substrato, e posteriormente (Figura 2C) Substrato e Extrato de Levedura, analisando como fator de resposta a produção de biomassa celular.

Figura 2: Superfície de resposta para as variáveis Agitação e Extrato de Levedura (A), Agitação e Substrato (B) e Substrato e Extrato de Levedura (C).



Fonte: Autoria Própria

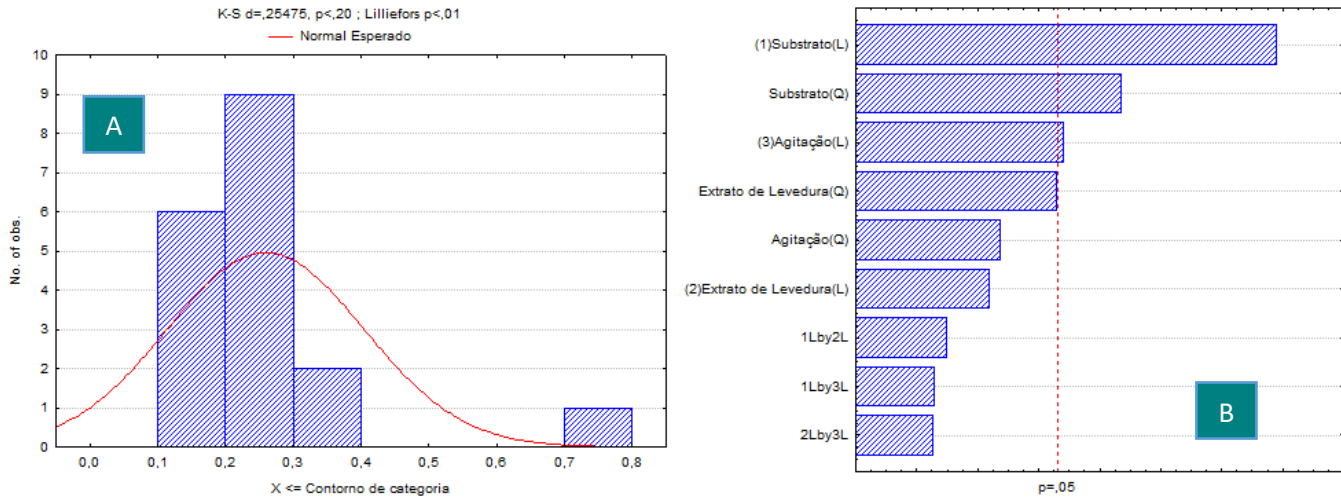
A produção de Biomassa foi influenciada positivamente pelo aumento da concentração de Substrato (B e C) e Agitação (A e B). Em relação a Concentração de Extrato de Levedura foi verificado maior produção micelial quanto valores intermediários foram empregados. Possivelmente a agitação estimulou o metabolismo respiratório do fungo, promovendo maior consumo da fonte de carbono e maior crescimento celular. Similarmente ao verificado no presente estudo (Figura 2C), Cunha et al. (2012) reportaram que concentrações de 2,42 g de Extrato de Levedura contribuíram para maior crescimento celular e também para biossíntese de exopolissacarídeo pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Outro aspecto interessante, é que possivelmente pode haver uma relação C:N associada ao crescimento micelial do fungo. De fato, alguns trabalhos descrevem a relação C:N como um parâmetro que influencia o crescimento micelial fúngico em cultivo para produção de micoproteína (ZAAKI; SAID, 2018).

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE, EXTRATO DE LEVEDURA E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO SOBRE O PARÂMETRO RENDIMENTO EM BIOMASSA

A Figura 3 apresenta o histograma de normalidade para os dados de produção de Biomassa. Conforme pode ser verificado na Figura 3A, o valor do coeficiente de Kolmogorov-Smirnove (K-S d) é maior que Alpha ($\alpha = 0.05$), apresentando normalidade a um nível de 95% de confiança. Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser observados através do diagrama de Pareto (Figura

3B), no qual valores localizados a direita da a linha tracejada são considerados significativos, analisados no nível de significância de 5%.

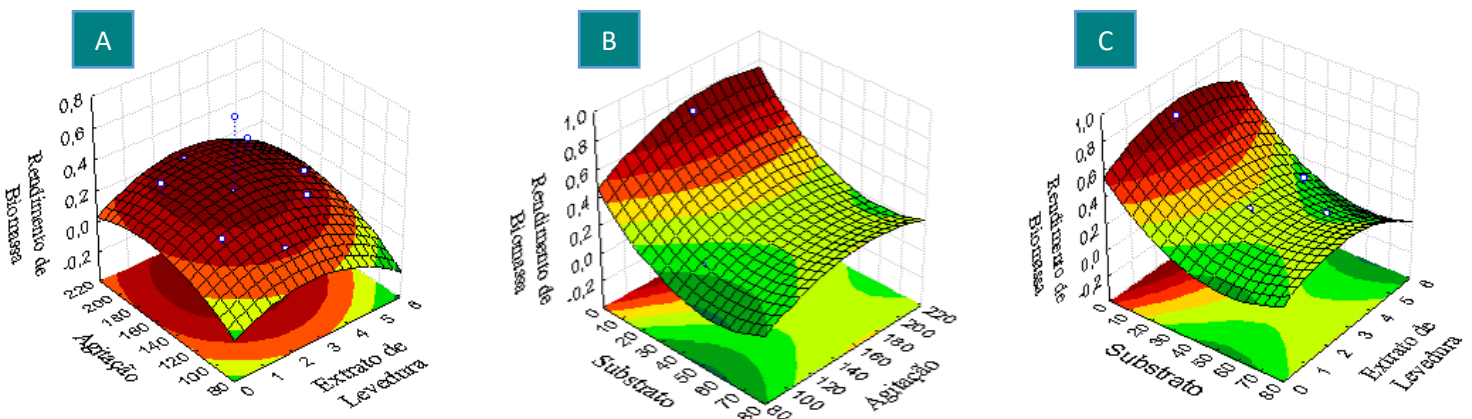
Figura 3: histograma de distribuição normal para rendimento de Biomassa (A). Diagrama de Pareto para a Rendimento em Biomassa (B).



Fonte: Autoria Própria

Observa-se que as variáveis: Substrato (efeito Linear e Quadrático) e Agitação (Linear) apresentaram significância estatística com nível de confiança de 95%, nota-se que a variável Extrato de Levedura apresentou significância inferior a 5%. Para viabilizar a observação dos efeitos, foi construído gráficos da superfície de resposta (Figura 4). Inicialmente é apresentada (Figura 4A) a superfície de resposta para as variáveis Agitação e Extrato de Levedura, seguida da (Figura 4B) Agitação e Substrato, e posteriormente (Figura 4C) Substrato e Extrato de Levedura, analisando como fator de resposta o rendimento da produção de biomassa celular produzida pelo *L. theobromae* MMPI.

Figura 4: Superfície de resposta para as variáveis Agitação e Extrato de Levedura (A), Agitação e Substrato (B) e Substrato e Extrato de Levedura (C).



Fonte: Autoria Própria

Nota-se que o rendimento da produção de Biomassa sofreu influência positiva com o aumento da Agitação (A e B) e influência negativa com o aumento da concentração da fonte de carbono (B e C).

Pelo diagrama de Pareto é observado que a variável Extrato de Levedura não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre o parâmetro Rendimento. Entretanto quando, a sensibilidade estatística é reduzida para um nível de 90% ($p < 0,1$), o rendimento também é influenciado positivamente pela fonte de nitrogênio avaliada. Conforme também verificado em relação a produção micelial, valores intermediários de concentração de extrato de levedura também contribuíram para maior rendimento em biomassa micelial.

CONCLUSÕES

Sacarose e extrato de levedura mostraram ser bons substratos para a produção de biomassa micelial pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Os parâmetros concentração de Sacarose (Linear), Agitação (Linear) e Extrato de Levedura (Linear e Quadrática) apresentaram efeitos significativos, ao nível de 95% de confiança, sobre a produção de biomassa micelial.

A produção máxima de biomassa estimada pelo modelo foi de $24,439 \text{ gL}^{-1}$, utilizando agitação de 413 rpm, concentração de Substrato de $271,25 \text{ gL}^{-1}$ e concentração de Extrato de Levedura de $5,94 \text{ gL}^{-1}$.

Para o rendimento em biomassa celular, os efeitos Substrato (Linear e Quadrático) e Agitação (Linear) foram estatisticamente significativos. A variável concentração de extrato de levedura não apresentou efeito significante a 95% de confiança.

A maior resposta para rendimento estimada pelo modelo foi de $0,233 \text{ gg}^{-1}$, utilizando agitação de 172,6 rpm, concentração de Substrato de $58,15 \text{ gL}^{-1}$ e concentração de Extrato de Levedura de $2,77 \text{ gL}^{-1}$.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Araucária FA - Paraná/Brasil e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Brasil.

REFERÊNCIAS

CUNHA, M. A. A. DA; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 39, p. 1179–1188, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10295-012-1112-2> Acesso em: 14 agosto 2020.

DERBYSHIRE, E.; AYOUB, K. T. Mycoprotein: Nutritional and Health Properties. *Nutrition Today*, v. 54, n. 1, p. 7–15, 2019. Disponível em: <http://journals.lww.com/00017285-201901000-00004>. Acesso em: 14 agosto 2020.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUNLOP, M. V.; KILROE, S. P.; BOWTELL, J. L.; et al. Mycoprotein represents a bioavailable and insulinotropic non-animal-derived dietary protein source: A dose-response study. *British Journal of Nutrition*, v. 118, n. 9, p. 673–685, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114517002409>. Acesso em: 14 agosto 2020.

VOGEL, H. J. A. Convenient Growth Medium for Neurospora (Medium and). *Microbial Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42–47, 1956.

ZAKI, M.; SAID, S. D. *Trichoderma Reesei* single cell protein production from rice straw pulp in solid-state fermentation. *Materials Science and Engineering*, v. 345, p. 012043, 2018. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/345/1/012043/pdf>. Acesso em: 28 set. 2020.